

尿中及び血清中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性に関する研究

著者	石渡 俊二
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	224
URL	http://hdl.handle.net/10097/45986

尿中及び血清中修飾核酸の腫瘍マーカーへの
応用性に関する研究

東北大学大学院薬学研究科

石 渡 俊 二

目次

緒言	・・・ 1
第1章 尿中修飾核酸量の検討	・・・ 4
第1節 はじめに	
第2節 尿中修飾核酸定量法の白血病モニタリングへの応用	
第3節 健常人尿中修飾核酸量の詳細な検討	
第4節 考察	
第2章 血清中修飾核酸定量法の開発	・・・ 16
第1節 はじめに	
第2節 高感度1-メチルアデノシン定量法の確立	
第3節 血清の前処理法の確立	
第4節 再現性試験	
第5節 考察	
第3章 担癌マウス血清中修飾核酸量の検討	・・・ 25
第1節 はじめに	
第2節 腹水癌モデル	
第3節 固形癌モデル	
第4節 考察	
第4章 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討	・・・ 31
第1節 はじめに	
第2節 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討	
第3節 考察	
第5章 総括及び結論	・・・ 37
第6章 実験材料及び方法	・・・ 40
引用文献	・・・ 47
謝辞	・・・ 50

略語表

本文及び図表中に以下の略語を用いた。

ALL	: acute lymphoblastic leukemia	(急性リンパ性白血病)
ALP	: alkaline phosphatase	
AML	: acute myelogenous leukemia	(急性骨髄性白血病)
AMMoL	: acute myelomonocytic leukemia	(急性骨髄単球性白血病)
ATL	: adult T cell leukemia	(成人 T 細胞白血病)
BSA	: bovine serum albumin	
CML	: chronic myelogenous leukemia	(慢性骨髄性白血病)
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay	
HPLC	: high performance liquid chromatography	
HRP	: horseradish peroxidase	
ML	: malignant lymphoma	(悪性リンパ腫)
MM	: multiple myeloma	(多発性骨髄腫)
NHL	: non-Hodgkin's lymphoma	(非ホジキンリンパ腫)
PBS	: phosphate-buffered saline	
RNA	: ribonucleic acid	
SD	: standard deviation	
SE	: standard error	
TMBZ	: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	
tRNA	: transfer ribonucleic acid	

論文一覧

以下の論文を基礎論文とし、本論文を作成した。

1. Itoh, K., Konno, T., Sasaki, T., Ishiwata, S., Ishida, N. & Mizugaki, M. Relationship of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine to activity of leukemia and lymphoma *Clin. Chim. Acta* **206**, 181-189 (1992)
2. Itoh, K., Ishiwata, S., Ishida, N. & Mizugaki, M. Diagnostic use of anti-modified nucleoside monoclonal antibody *Tohoku J. Exp. Med.* **168**, 329-331 (1992)
3. Itoh, K., Aida, S., Ishiwata, S., Sasaki, S., Ishida, N. & Mizugaki, M. Urinary excretion patterns of modified nucleosides, pseudouridine and 1-methyladenosine, in healthy individuals *Clin. Chim. Acta* **217**, 221-223 (1993)
4. Ishiwata, S., Itoh, K., Ishida, N. & Mizugaki, M. Comparison of serum and urinary levels of modified nucleoside, 1-methyladenosine in cancer patients using a monoclonal antibody-based inhibition ELISA *Tohoku J. Exp. Med.* (in press)

緒言

RNAの構成成分としてメチル化、異性化などの修飾を受けた修飾核酸が天然に存在することが知られている。修飾核酸は特にtRNA中に多く存在し、その種類は70種以上に及び¹⁾、tRNAを構成する核酸全体の約20%を占めている²⁾。これらの修飾核酸はtRNA分子骨格形成後になされる転写後修飾により生成するが、この反応に携わる酵素はtRNA分子種や修飾を受ける核酸の種類や位置により異なると考えられている³⁻⁵⁾。tRNA中の修飾核酸は、tRNAが受容するアミノ酸の変換⁶⁾やコドン-アンチコドン認識の正確さの向上⁷⁻⁹⁾など生命活動を営む上で必須の機能の一部を担っている。大多数の修飾核酸はモノヌクレオシドまで分解された後、核酸の再利用経路であるサルベージ回路に入ることなく排泄される¹⁰⁾。これらの遊離した修飾核酸は種々の生理活性を有することが知られ、石田らは、マウスのエールリッヒ癌性腹水中に存在する1-メチルアデノシンや5-メチルシチジンが免疫抑制活性を有することを報告している。¹¹⁻¹³⁾

細胞を用いた試験管内の検討において修飾核酸と癌化との関連性が示されている。例えば、癌組織において、RNAのメチル化活性が異常に亢進あるいは減少していることが知られている¹⁴⁾。また、癌組織中には癌特異的な修飾を受けたtRNA分子種が存在することも示されている^{15,16)}。

尿中に排泄された修飾核酸は、腫瘍マーカーとしての応用性が検討されてきたが、これまで、主にHPLCによる尿中の修飾核酸の定量が行われ、癌患者尿中に修飾核酸が増加することが示されてきた¹⁷⁻²⁰⁾。一方、当研究室では、モノクローナル抗体を用いたELISA法を確立し、尿中シュドウリジンと1-メチルアデノシンが癌患者、特に白血病やリンパ腫患者のスクリーニングに有用なことを示してきた²¹⁻²³⁾。これまで数多くの物質が腫瘍マーカーとして

検討され、臨床応用されているものも多い。しかし、実際には数種の腫瘍マーカーが併用され診断の補助的手段として用いられるのが現状であり、満足しうるものは未だ見出されていない²⁴⁾。また、昨今の癌治療技術の進歩に伴い、癌の病態を的確に反映する、モニタリングに有用な腫瘍マーカーが望まれている²⁴⁾。

ところで、血清中の修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性についても検討がなされてきた²⁵⁻³¹⁾。血清検体を用いた場合、尿検体で必要とされるクレアチニン補正を行う必要がないこと、小児や腎障害を有する患者でしばしば認められる偽陽性例が発生しにくいこと、さらに、動物モデルを作製した場合に試料の採取が容易であること、などの利点があげられる。Higashino らのグループは HPLC を用いた血清中シュードウリジンの測定法を確立し、肺小細胞癌や肝細胞癌患者で血清中量が増加していることを明らかにしているが^{27,28)}、検出感度上の問題から血清中の修飾核酸量の検討は主にシュードウリジンに限られ、また、迅速性と簡便性に優れる ELISA 法による測定もなされていなかった。血清中の修飾核酸の分析は腫瘍マーカーへの応用性の証明のみならず、修飾核酸の体内動態の解析にも応用可能であり、非常に興味深い検討事項と考えられる。

これらの研究背景を踏まえて、著者は尿中及び血清中の修飾核酸の腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにするため、以下の項目について検討した。

1. 尿中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用を目的として、
 - (1)白血病患者のモニタリングへの応用性
 - (2)健常人の性差、年齢差
2. 血清中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用を目的として、
 - (1)血清中 1-メチルアデノシンの定量法の確立
 - (2)担癌モデルを用いた血清中修飾核酸量の変動

(3) 健常人及び癌患者血清中 1-メチルアデノシンとシュードウリジン
量の相違

得られた結果は第 5 章に総括してあるが、その経緯を以下に詳述する。

第1章 尿中修飾核酸量の検討

第1節 はじめに

これまでも尿中修飾核酸の腫瘍マーカーとしての応用性が検討されてきた¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、従来の検討は主に HPLC 法により行われ、ELISA 法を用いた報告は乏しかった。既に当教室においては、ELISA 法を用いた検討から、尿中シュードウリジンと1-メチルアデノシンの陽性例が特に白血病、リンパ腫で多くみられることを明らかにしている²¹⁻²³⁾。そこで、これらの疾患を対象とし、白血病あるいはリンパ腫の種類による尿中の修飾核酸量の比較を行った。また、モニタリングへの応用性を目的として、疾患の状態を尿中修飾核酸が反映するか否かについても検討を加えた。

これまで、腫瘍マーカーとしての応用性を検討する際に基本となる、尿中修飾核酸量の健常人における性差、年齢差などについての基礎的検討は乏しかった。そこで本章では、この点についても検討した。

第2節 尿中修飾核酸定量法の白血病モニタリングへの応用

健常人、白血病患者及びリンパ腫患者の尿中のシュードウリジン、1-メチルアデノシン量を測定した結果を示した (Figure 1-1, 1-2)。健常人 33 人の尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量の平均値は 31.2 ± 9.9 nmol/ μ mol クレアチニン、 1.91 ± 0.66 nmol/ μ mol クレアチニンであった。そこで、平均値に 2 SD を加えた値である 51.0 nmol/ μ mol クレアチニン、3.23 nmol/ μ mol クレアチニンをそれぞれカットオフ値として設定し、この値以上の症例を陽性とした。

白血病及びリンパ腫患者の尿は治療前に採取したものを用いた。白血病及びリンパ腫患者全例の尿中シュードウリジン量の平均値は 61.6-82.8 nmol/

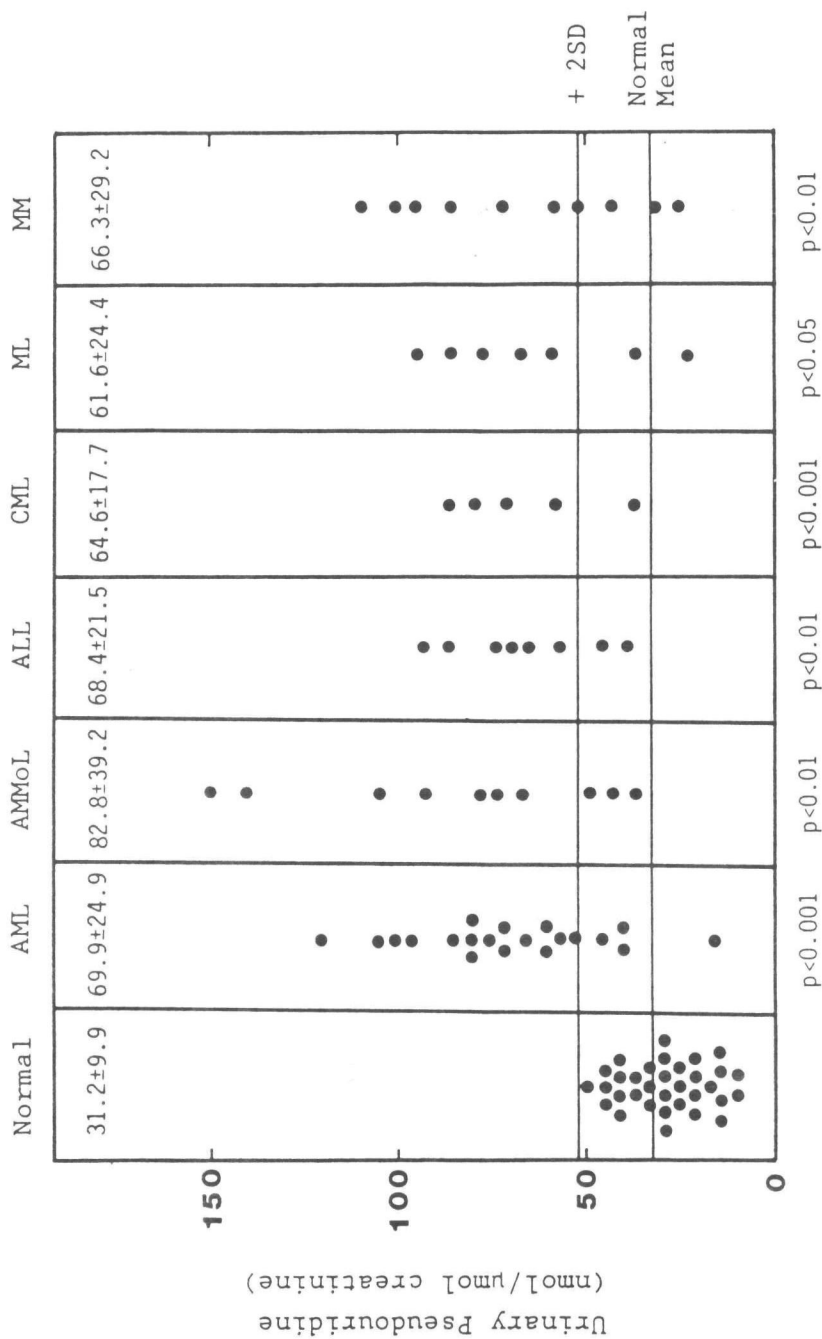


Figure 1-1 Urinary excretion levels of pseudouridine in 33 normal controls and 60 patients with leukemia and lymphoma. Twenty patients of AML (acute myelogenous leukemia), 10 of AMMoL (acute myelomonocytic leukemia), 8 of ALL (acute lymphoblastic leukemia), 5 of CML (chronic myelogenous leukemia), 7 of ML (malignant lymphoma) and 10 of MM (multiple myeloma) were included. All were in active disease status determined by hematologic examination. The significance of variation was determined by using *t*-test, comparing each group with the healthy donors.

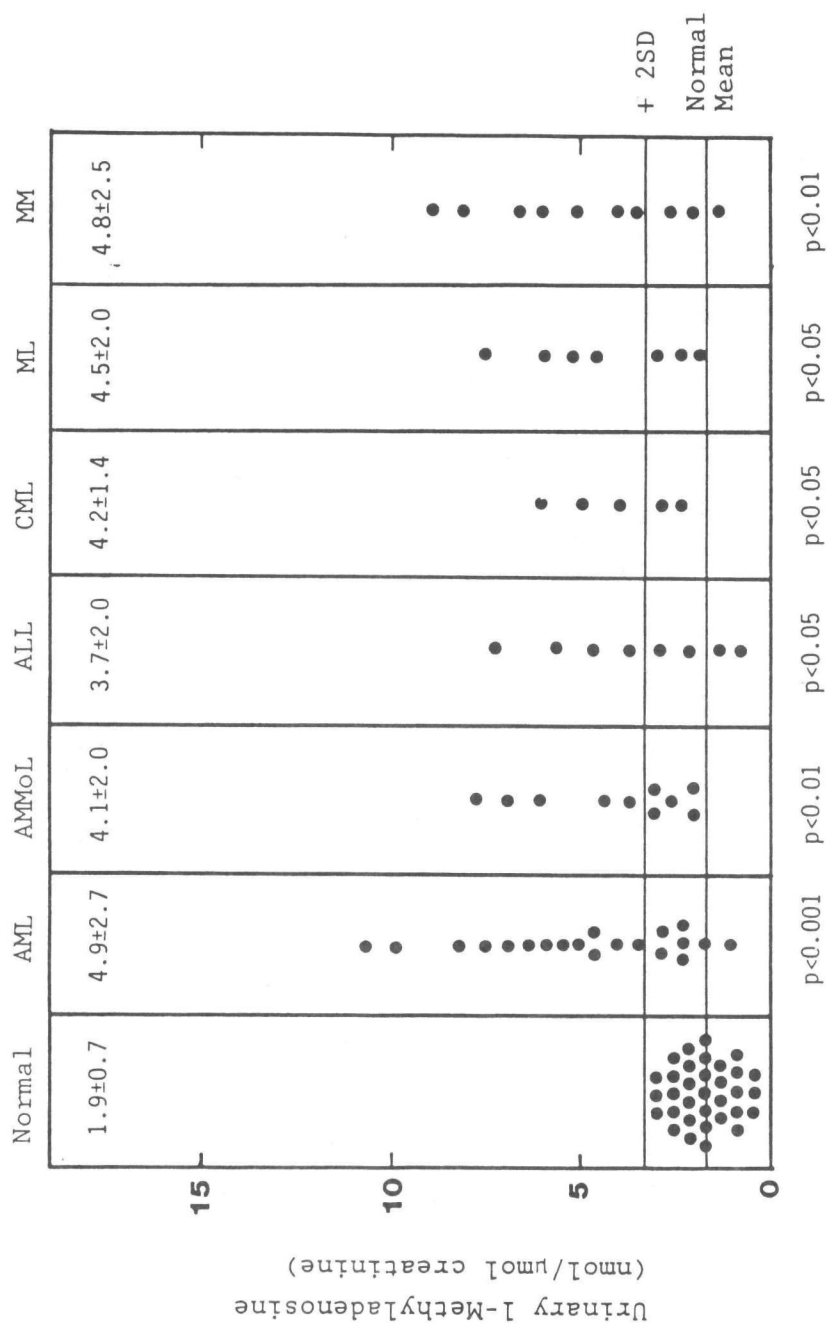


Figure 1-2 Urinary excretion levels of 1-methyladenosine in 33 normal controls and 60 patients with leukemia and lymphoma. The patients are described in Figure 1-1.

μmol クレアチニン であり、健常人と比較して有意に高値であった。同様に 1-メチルアデノシン量の平均値は 3.70-4.90 nmol/ μmol クレアチニンであり、健常人との差は有意であった。白血病及びリンパ腫患者の尿中シュードウリジンの陽性率は 77% (46/60)、1-メチルアデノシンの陽性率は 62% (37/60) であった (Table 1-1)。シュードウリジンあるいは 1-メチルアデノシンのいずれかが陽性であったものは 87% (52/60) であった。

Table 1-1 Positive rates in urinary pseudouridine and 1-methyladenosine in patients with leukemia and lymphoma determined by single assay or combination assay^a

Type of disease	Single assay ^b		Combination assay ^b
	Pseudouridine	1-Methyladenosine	
AML ^c	85 (17/20)	65 (13/20)	90 (18/20)
AMMoL	70 (7/10)	50 (5/10)	90 (9/10)
ALL	75 (6/8)	63 (5/8)	88 (7/8)
CML	80 (4/5)	60 (3/5)	80 (4/5)
ML	71 (5/7)	57 (4/7)	86 (6/7)
MM	70 (7/10)	70 (7/10)	80 (8/10)
Total	77 (46/60)	62 (37/60)	87 (52/60)

^aThe patients who had levels of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine above normal mean + 2SD values (51.0 and 3.23 nmol/ μmol creatinine) were defined as positive cases.

^bValues are expressed as % positive. The number in parentheses shows the positive cases per tested cases.

^cAbbreviations of the diseases are as follows; AML: acute myelogenous leukemia, AMMoL: acute myelomonocytic leukemia, ALL: acute lymphoblastic leukemia, CML: chronic myelogenous leukemia, ML: malignant lymphoma, MM: multiple myeloma

白血病及びリンパ腫患者を病態により寛解、再発、安定の3群に分け、各々の状態におけるシュードウリジン、1-メチルアデノシン量の変動を検討した (Figure 1-3, 1-4)。寛解導入群では3例を除き、化学療法後にシュードウリジン及び1-メチルアデノシンとも正常域以下にまで低下した。再発群では5例を除き、シュードウリジン、1-メチルアデノシンともよく病態を反映した。安定群では、シュードウリジン及び1-メチルアデノシン量はカットオフ値前後であった。

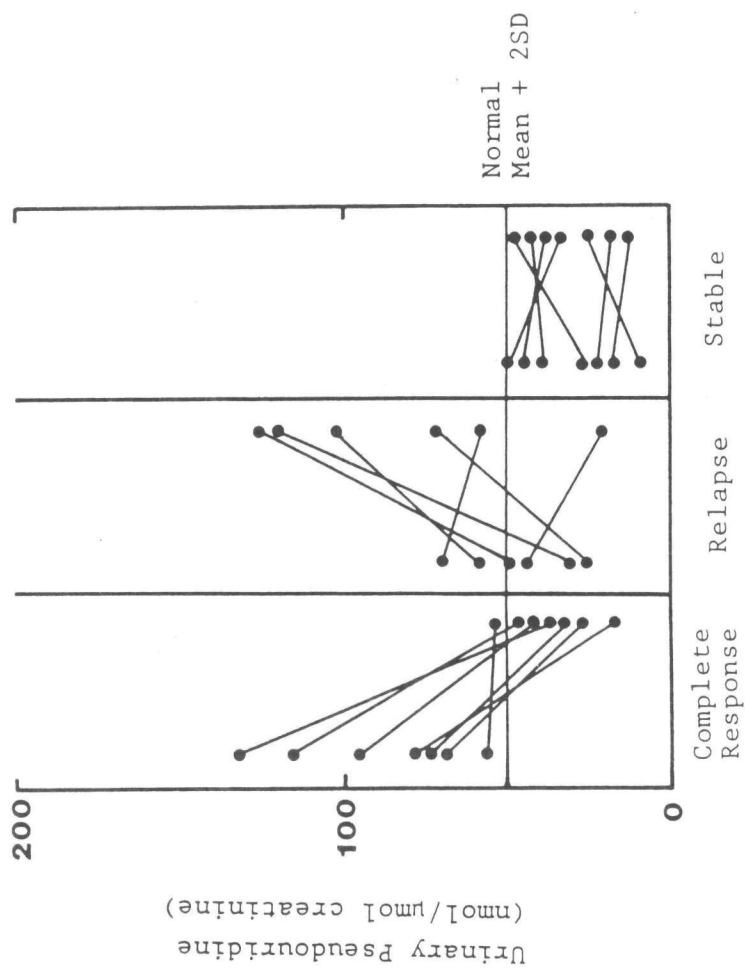


Figure 1-3 Changes in the urinary excretion levels of pseudouridine with the changes in clinical status of patients with leukemia and lymphoma. Included were 7 of complete responsive cases, 6 of relapsed cases and 7 of stable cases.

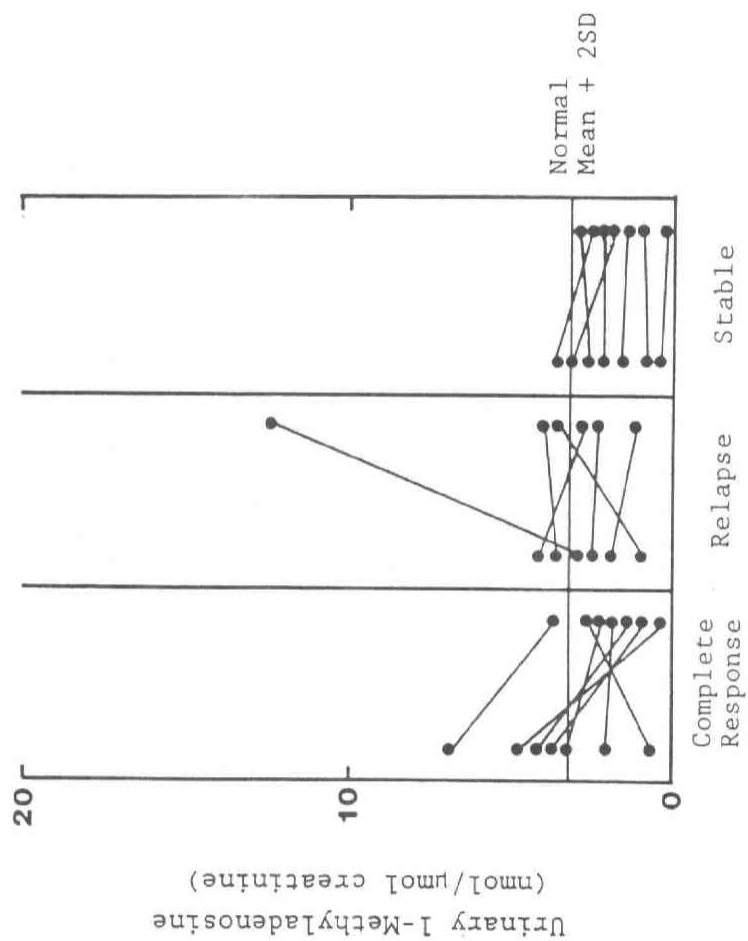


Figure 1-4 Changes in the urinary excretion levels of 1-methyladenosine with the changes in clinical status of patients with leukemia and lymphoma. The patients are described in Figure 1-3.

第3節 健常人尿中修飾核酸量の詳細な検討

シュードウリジンについては健常人 366 人（男性 175 人、女性 191 人）、1-メチルアデノシンについては健常人 361 人（男性 176 人、女性 185 人）を対象とし、尿中含量の測定を既に確立された阻害 ELISA 法により行った（Table 1-2）。

健常人の尿中シュードウリジン量の平均値は 28.6 ± 12.6 nmol/ μ mol クレアチニンであり、各年代の男性の尿中シュードウリジン量は 26.9-34.1 nmol/ μ mol クレアチニン、女性は 24.2-33.4 nmol/ μ mol クレアチニンの範囲内であった。尿中1-メチルアデノシンの健常人全体の平均値は 2.11 ± 0.93 nmol/ μ mol クレアチニンであり、男性の1-メチルアデノシン量は 1.75-2.49 nmol/ μ mol クレアチニン、女性は 1.85-2.44 mol/ μ mol クレアチニンの範囲内であった。各々の性における年齢差、各年齢における性差は認められなかった。また、健常人 10 人（男性 7 人、女性 3 人）について 1 日に 4 回採取した尿中のシュードウリジン、1-メチルアデノシン量を検討した結果、日内変動は認められなかった（Table 1-3）。さらに 7 日間の尿中修飾核酸量を測定した結果、日差変動は認められなかった（Table 1-4）。

Table 1-2 Age and sex distributions in urinary excretions of pseudouridine and 1-methyladenosine in healthy individuals

Age	Male (nmol/ μ mol creatinine)	Female (nmol/ μ mol creatinine)
Pseudouridine		
6-9	27.9 \pm 11.9 (31)	28.5 \pm 13.3 (39)
10	32.7 \pm 13.9 (34)	26.7 \pm 10.9 (39)
20	31.3 \pm 12.7 (32)	31.5 \pm 15.6 (15)
30	27.5 \pm 13.4 (22)	25.5 \pm 9.3 (30)
40	26.9 \pm 8.6 (14)	24.2 \pm 12.2 (29)
50	29.2 \pm 9.2 (18)	33.4 \pm 15.7 (23)
60	34.1 \pm 10.8 (16)	33.0 \pm 9.4 (11)
70	27.7 \pm 13.0 (8)	26.9 \pm 6.7 (5)
Mean \pm SD	30.2 \pm 12.5(175)	26.6 \pm 11.6(191)
Total mean \pm SD	28.6 \pm 12.6(366)	
1-Methyladenosine		
6-9	1.89 \pm 0.78(31)	1.85 \pm 0.77(39)
10	1.75 \pm 1.01(37)	1.90 \pm 0.74(40)
20	1.96 \pm 0.84(33)	2.33 \pm 0.51(14)
30	2.28 \pm 0.73(22)	2.42 \pm 0.82(30)
40	2.37 \pm 1.05(12)	2.44 \pm 1.11(29)
50	2.30 \pm 0.88(18)	2.36 \pm 0.64(19)
60	2.49 \pm 0.79(14)	2.35 \pm 1.33(9)
70	2.07 \pm 0.71(9)	2.29 \pm 0.52(5)
Mean \pm SD	2.09 \pm 0.93(176)	2.13 \pm 0.91(185)
Total mean \pm SD	2.11 \pm 0.93(361)	

The number of subjects tested are shown in the parentheses.

Table 1-3 Variations within a day in the urinary excretion of pseudouridine and 1-methyladenosine in healthy individuals

Sampling time	Pseudouridine	1-Methyladenosine
	(nmol/ μ mol creatinine)	
9:00	28.0 \pm 6.4	1.14 \pm 0.28
12:00	29.9 \pm 6.2	1.40 \pm 0.39
15:00	25.3 \pm 12.0	1.28 \pm 0.28
18:00	24.3 \pm 13.7	1.47 \pm 0.47
24hr-pooled	27.9 \pm 12.0	1.27 \pm 0.19

Table 1-4 Daily variations in the urinary excretions of pseudouridine and 1-methyladenosine in healthy individuals

Day	Pseudouridine	1-Methyladenosine
	(nmol/ μ mol creatinine)	
1	27.9 \pm 15.6	1.14 \pm 0.28
2	18.7 \pm 11.1	0.99 \pm 0.53
3	22.6 \pm 11.6	1.17 \pm 0.38
4	22.2 \pm 7.8	1.21 \pm 0.63
5	22.5 \pm 14.6	1.02 \pm 0.64
6	27.7 \pm 14.2	1.27 \pm 0.41
7	21.4 \pm 15.8	1.39 \pm 0.97

第4節 考察

白血病及びリンパ腫患者において、健常人と比較して有意に高い量の尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシンが認められたが、疾患の種類の違いによる量的差異は認められなかった。一方、数例の例外を含むものの、尿中のシュードウリジン、1-メチルアデノシンは白血病の病態を良く反映した。以上の事実から、尿中のこれらの修飾核酸は疾患の種類よりも疾患の状態を良く反映することが明らかになった。今後、腫瘍マーカーとして、特にモニタリングに応用されることが期待される。

Tamuraらは尿中シュードウリジンと α -フェトプロテインあるいは癌胎児性抗原を併用することにより、それぞれ肝細胞癌あるいは肺小細胞癌の診断の信頼性が増加することを報告している^{17,18)}。今回、白血病、リンパ腫に対してシュードウリジンと1-メチルアデノシンを併せて用いることにより、それぞれの単独測定と比較して、白血病患者の陽性率の向上が認められた。両修飾核酸の併用により、より確実な診断が可能になるものと思われる。現在、白血病、リンパ腫の診断は主に骨髓穿刺により採取した骨髓液中の細胞像の解析により行われているが、激しい生体侵襲を伴うものであるため頻回使用が制限される。これに対し、尿検体を用いる本法は苦痛を与えずかつ簡便に実施できるため、患者病態のモニタリングへの応用が可能であり、従来の診断法の相補的な診断法として有用であると考えられる。

健常人における尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量の性差、年齢差は認められなかった。また、排泄量の日内変動及び日差変動も認められなかったことから、尿中修飾核酸が腫瘍に対して高い特異性を有するマーカーであることが明らかになった。尿中の修飾核酸量は癌組織におけるRNAの代謝回転の亢進により増加すると考えられているが、健常人ではその排泄量が年齢、性別、時間、日にち、さらには食事による影響を受けないことから、生

体内の RNA の代謝が厳密に制御されていることが示された。

第2章 血清中修飾核酸定量法の開発

第1節 はじめに

前章において、尿中修飾核酸の腫瘍マーカーとしての有用性について述べた。

尿試料は採取にあたり生体に対する侵襲がないという長所を持つ反面、一時尿を利用する場合にはクレアチニン補正が必要であること、腎障害を有する患者や小児ではクレアチニン排泄が少ないことに起因する偽陽性例が多く認められること、また、実験動物を利用する場合、定時に一定量の尿を採取するのが難しいこと、などの短所を持っている。

一方、血清中の修飾核酸は尿中に比べて極めて微量ではあるが、クレアチニン補正の必要もなく、より直接的に生体の状態を反映するものと考えられる。また、癌組織から尿へ修飾核酸を搬送しているのが血液循環系であることより、血清中の修飾核酸の解析は修飾核酸の体内動態の検討にも有用であると考えられる。そこで血清中修飾核酸の定量を目的として、水柿らにより確立された1-メチルアデノシンの酵素免疫測定法²³⁾を高感度化し、試料の前処理法について検討を加え、血清中1-メチルアデノシンの定量法を確立した。

第2節 高感度1-メチルアデノシン定量法の確立

ヒト血清中のシュードウリジン量は尿中量の約1/100であることが明らかにされていることから^{22, 28, 29)}、同じく修飾核酸である1-メチルアデノシンの血清中量と尿中量の比も同程度であることが推測された。本推測により算出される血清中1-メチルアデノシン量は5-100 ng/mlのレベルであり、10 ng/mlを測定限界とする従来法²³⁾による血清中1-メチルアデノシンの定量は困難であると考えられた。そこで、まず、1-メチルアデノシン定量法の高感度化を図った。

尿中量の測定に用いた従来法²³⁾を基本とし、二次抗体の標識酵素として西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を利用し、テトラメチルベンチジン（TMBZ）を発色基質として採用した結果、吸光度の増加が認められたものの、バックグラウンドの上昇も認められた（データ不掲）。そこで、2次抗体添加前に二回目のブロッキングを行った。ブロッキング剤としては1% BSA/0.05% Tween 20 含有 PBS を用いた（Figure 2-1）。

本改良法により得られた検量線を Figure 2-2 に示す。検量線は 1-1000 ng/ml の範囲で良好な直線性を示し、従来法に比べ検出感度が 10 倍上昇した。

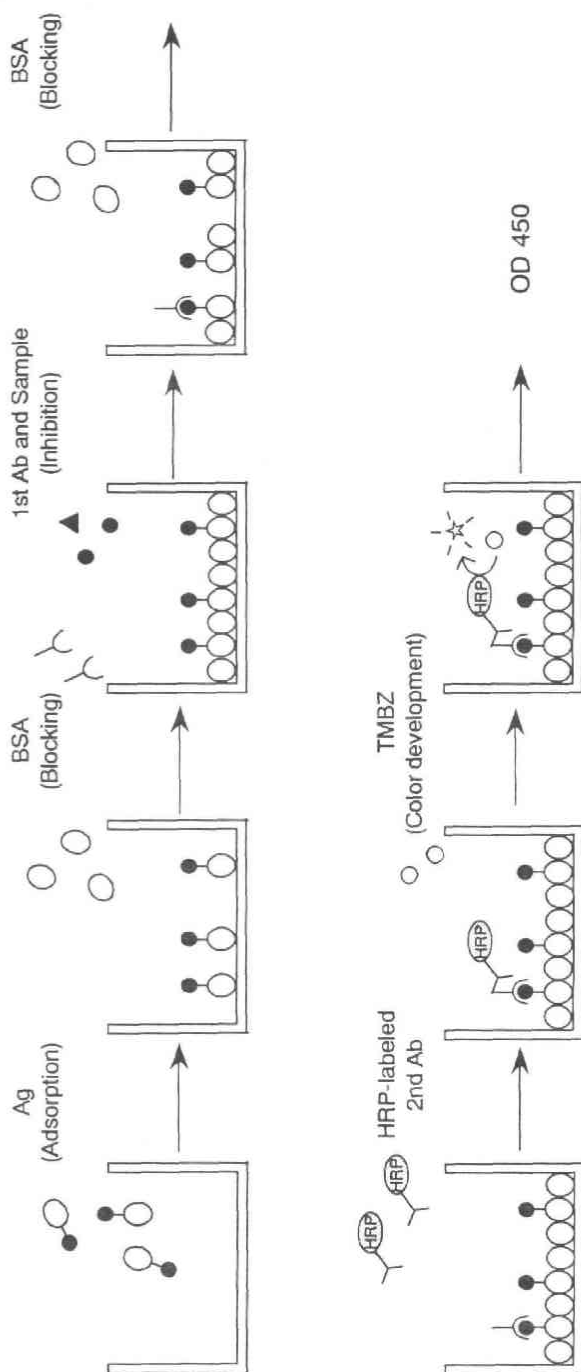


Figure 2-1 Procedure of highly sensitive inhibition ELISA for 1-methyladenosine.

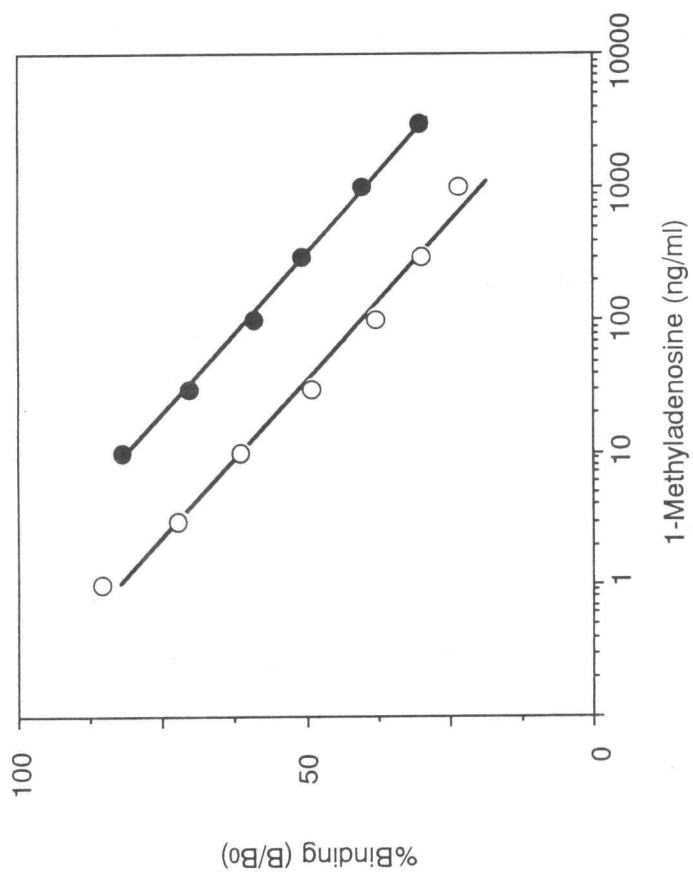


Figure 2-2 Standard curve for the quantitation of 1-methyladenosine. Data are given in the form of a logit plot. (● :the former method, ○ :the established method)

第3節 血清の前処理法の確立

前処理を行うことなしに、血清中の1-メチルアデノシンの定量を試みたが、血清タンパクによると考えられる妨害が認められた。そこで、血清の前処理法としてセントリコンー10（分画分子量10000）を用いた遠心限外ろ過法を検討した。前処理後血清が測定試料として利用可能であることを確認するため、前処理後血清への標準品の添加回収試験を行い回収率を検討した。さらに限外ろ過操作により検体中の1-メチルアデノシン濃度が変化しないことを確認するため、前処理前血清への添加回収試験を行った。標準品の添加量はヒト血清中の推定存在量とほぼ等しい30 ng/mlとした。結果をTable 2-1, 2-2に示す。

血清の限外ろ過後に標準品30 ng/mlを添加した試料における回収率は98.3-114%、ろ過前に添加した試料における回収率は87.0-112%であり、いずれも良好な値を示した。

第4節 再現性試験

（1） 同時再現性試験

阻害ELISAに用いた96ウェルプレートの同時再現性を検討した結果をTable 2-3に示す。遠心限外ろ過による前処理を行った血清試料の変動係数(C.V.(%))は9.84-13.5%であり、各試料において良好な再現性が認められた。

（2） 日差再現性試験

同一血清試料中の1-メチルアデノシン含量の測定日相違による変化を検討した(Table 2-4)。前処理を行った血清試料の変動係数(C.V.(%))は2.70-8.39%であり、良好な日差再現性が認められた。

Table 2-1 Recovery of 1-methyladenosine added to serum samples after ultrafiltration

Sample	1-Methyladenosine (ng/ml)			Recovery (%)
	Added	Measured	Recovered	
1	0	15.6		
	30	45.1	29.5	98
2	0	17.9		
	30	52.2	34.3	114
3	0	23.3		
	30	57.7	34.4	115
4	0	28.7		
	30	60.9	32.2	107

Table 2-2 Recovery of 1-methyladenosine added to serum samples before ultrafiltration

Sample	1-Methyladenosine (ng/ml)			Recovery (%)
	Added	Measured	Recovered	
5	0	34.3		
	30	68.0	33.7	112
6	0	32.0		
	30	64.2	32.2	107
7	0	37.6		
	30	70.5	32.9	110
8	0	34.1		
	30	60.2	26.1	87

Table 2-3 Intra-assay variation of inhibition ELISA for 1-methyladenosine in serum samples. Simultaneous reappearance in each well of a plate was tested.

Well	1-Methyladenosine (ng/ml)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
1	20.7	25.9	32.8	29.0
2	22.6	29.8	34.5	40.6
3	24.4	30.8	32.7	33.2
4	22.6	31.3	39.3	38.7
5	25.9	29.8	39.1	35.0
6	20.8	31.6	37.7	30.8
7	24.7	34.8	40.6	38.7
8	17.6	36.3	43.1	38.1
9	26.9	40.8	40.8	40.8
Average	22.9	32.3	32.4	36.1
S.D.	2.92	4.35	3.72	4.30
C.V. (%)	12.8	13.5	9.84	11.9

Table 2-4 Inter-assay variation of inhibition ELISA for 1-methyladenosine in serum samples. Reappearance in different days was tested.

Day	1-Methyladenosine (ng/ml)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
1	29.5	29.4	29.9	30.0
2	31.0	31.7	26.4	33.5
3	29.7	33.8	25.6	29.6
Average	30.1	31.6	27.3	31.0
S.D.	0.81	2.20	2.29	2.15
C.V. (%)	2.70	6.96	8.39	6.94

第5節 考察

一般に測定法の検出感度の改善を図る場合、検出信号の絶対値の拡大によって達成される絶対感度の向上と、バックグラウンドの低下により相対的に検出信号が感知されやすくなることによって達成される相対感度の向上について考慮する必要がある。本測定法では、絶対感度の向上法として、一般に検出感度に優れるとされる、標識酵素として HRP を、発色剤として TMBZ を使用する系を採用した。他方、二回のブロッキング操作を行うことで相対感度の向上を図った。本測定法の測定限界は従来法の 1/10 の 1 ng/ml であり、血清中の 1-メチルアデノシン測定に十分応用可能であった。Umegae らはポストカラムで蛍光誘導体化を行うことによって、シュードウリジンの検出限界を約 10 ng/ml まで向上させている²⁶⁾。しかし、これまで感度的な問題から、血清中のシュードウリジン以外の修飾核酸定量に関する報告は乏しく、Gehrke らのグループにより報告されているのみである²⁵⁾。本測定法でなされた改良は、修飾核酸の定量に限らず、他の免疫測定法にも広く応用可能と考えられる。

一般に血中化合物の定量を免疫測定法で行う場合、夾雑物の影響を軽減するために血清試料の希釈を行うが、血清中の修飾核酸は微量であるため、希釈を行うことは困難であった。そこで、前処理法として、限外ろ過法に着目した。前処理後血清が測定試料として利用可能であることを確認するため、前処理後血清への標準品の添加回収試験を行い回収率を検討した。さらに限外ろ過操作により検体中の 1-メチルアデノシン濃度が変化しないことを確認するため、前処理前血清への添加回収試験を行った。いずれの試験でも回収率は良好であり、前処理法として限外ろ過法が適当であることが明らかになった。また、同時再現性、日差再現性ともに良好であり、本測定法が信頼性の高い測定法であることが明らかになった。

ところで、修飾核酸の中でシュードウリジンは血清中腫瘍マーカーとして応用性が検討されてきたほとんど唯一の化合物である。これまでに血中シュードウリジンが肺小細胞癌および肝細胞癌のマーカーとして有用であることが報告されている^{27,28)}。今回、著者は、既に尿中レベルの解析から腫瘍マーカーとしてその有用性が明らかにされている1-メチルアデノシンの高感度測定法を確立した。本測定法を用いて血清中の1-メチルアデノシンを測定することにより、癌のスクリーニングやモニタリング、あるいは生体内での存在意義の解明に新たな道が開かれるものと考えている。

第3章 担癌マウス血清中修飾核酸量の検討

第1節 はじめに

血清中に修飾核酸は微量しか存在しないため、感度上の問題から血清中量の測定は困難であった。このため担癌動物を用いた基礎的検討も主に尿を用いて行われ、血清中の修飾核酸量の変動についての報告はほとんどなされていなかった。著者は、従来血清診断に利用されてきたシュードウリジンに加えて、前章でその測定法を確立した1-メチルアデノシンが新たなマーカーとなりうるか否かを検討した。すなわち、腹水型腫瘍及び固形腫瘍を移植した二つのモデルについて、担癌にともなう血清中量の変動、および両修飾核酸の変動パターンの相違について検討を加えた。

第2節 腹水癌モデル

BALB/c マウスに同系マウス由来の Meth A 繊維芽細胞腫細胞を腹腔内移植して作製した腹水癌モデルの腹水量および腹水中のパック細胞容積 (packed cell volume) を測定した結果を Figure 3-1, 3-2 に示した。腹水量は移植後5日目以降12日目まで増加した。腹水中のパック細胞容積は移植後5日目にわずかな増加が認められ、以後12日目まで増加した。腹水量とパック細胞容積はほぼ同様の増加パターンを示すことが明らかになった。

同一マウスの血清中の1-メチルアデノシンとシュードウリジンの定量結果を Figure 3-3 に示した。非担癌マウス血清中の1-メチルアデノシン、シュードウリジン量はそれぞれ 60.1 ± 13.1 ng/ml、 2.68 ± 0.50 μ g/mlであった。担癌マウス血清中の1-メチルアデノシン量は移植後5日目までは変化が認められなかったが、その後増加し、12日目には正常値の6.7倍の 404 ± 59 ng/mlに達した。一方、シュードウリジンは移植後9日目以降に増加し、12

日目の血中量は正常値の 2.2 倍の $5.82 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。

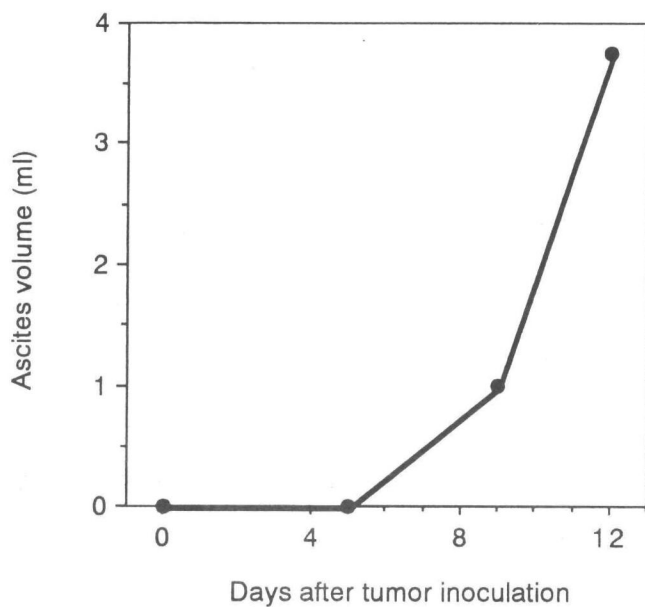


Figure 3-1 Increase of ascites volume of mice bearing ascites tumor. The data are the means for triplicate samples.

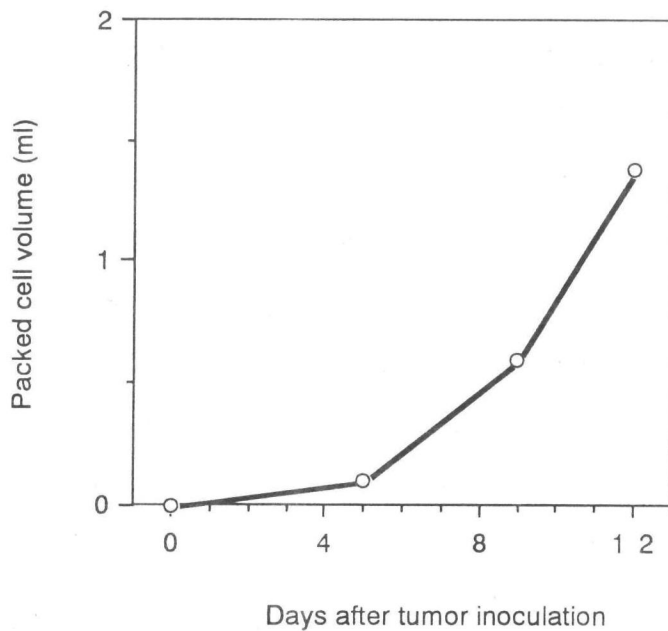


Figure 3-2 Increase of packed cell volume in ascites of mice bearing ascites tumor. Cell volume was measured as precipitate after centrifugation. The data are the means for triplicate samples.

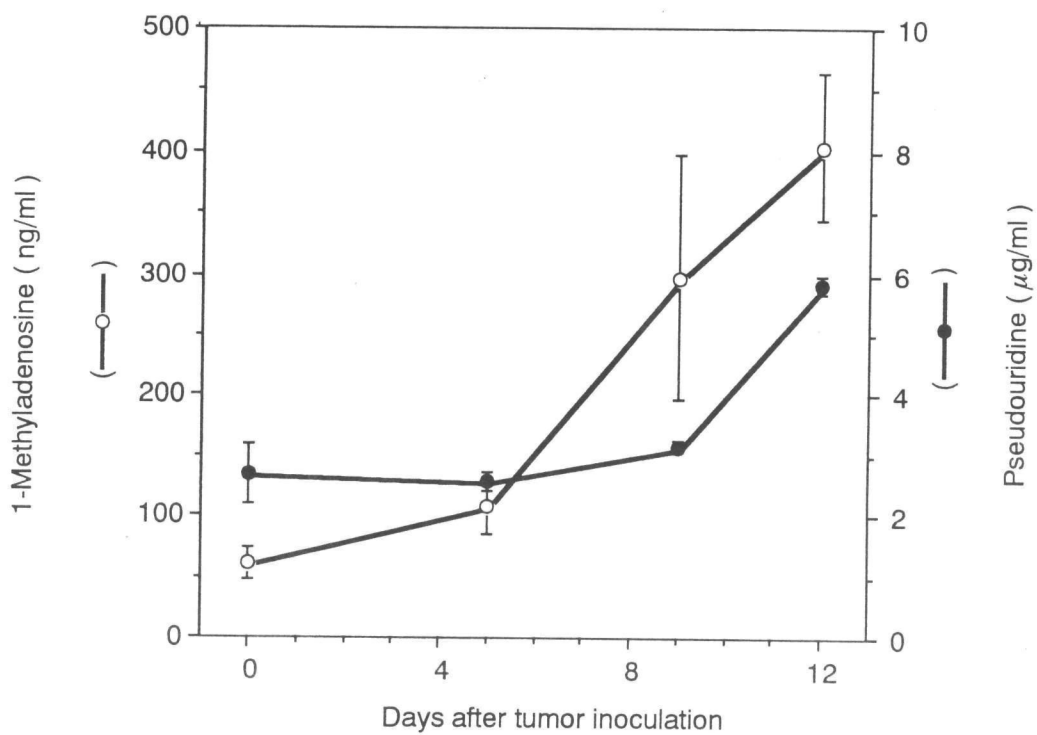


Figure 3-3 Time course of 1-methyladenosine and pseudouridine levels in sera of mice bearing ascites tumor. Bars represent standard error.

第3節 固形癌モデル

BALB/c マウスに Meth A 細胞を皮内移植して作製した固形癌モデルの腫瘍の大きさを経時的に測定した結果を Figure 3-4 に示した。腫瘍は移植後 5 日目に観察され、21 日目まではほぼ一定の速さで増大した。

そこで、本モデルマウス血清中の 1-メチルアデノシン、シュードウリジン を測定した結果を Figure 3-5 に示した。1-メチルアデノシンは移植後 5 日目以降増加し、19 日目には正常値の 1.8 倍の 112 ± 3 ng/ml に達した。その後 22 日までの 3 日間に急激に増加し、正常値の 4.2 倍の 253 ± 5 ng/ml に達した。他方、血清中シュードウリジンは 11 日目に正常値の 2.7 倍の 7.16 ± 0.24 μ g/ml まで増加した後、8 日後の 19 日目以降に再び増加が認められ、22 日目には正常値の 3.7 倍の 10.0 ± 0.6 μ g/ml なる高値を示した。

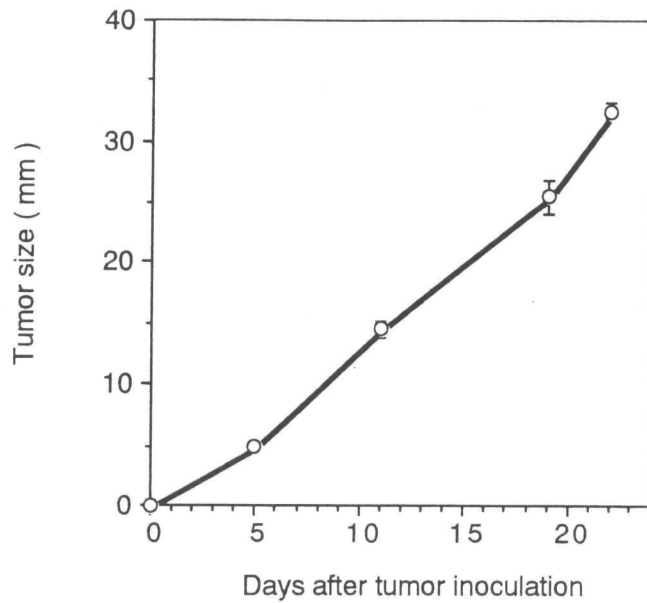


Figure 3-4 Growth of tumor after intradermal inoculation of Meth A cells. Tumor size was calculated as the square root of the product of long diameter and short diameter. Bars represent standard error.

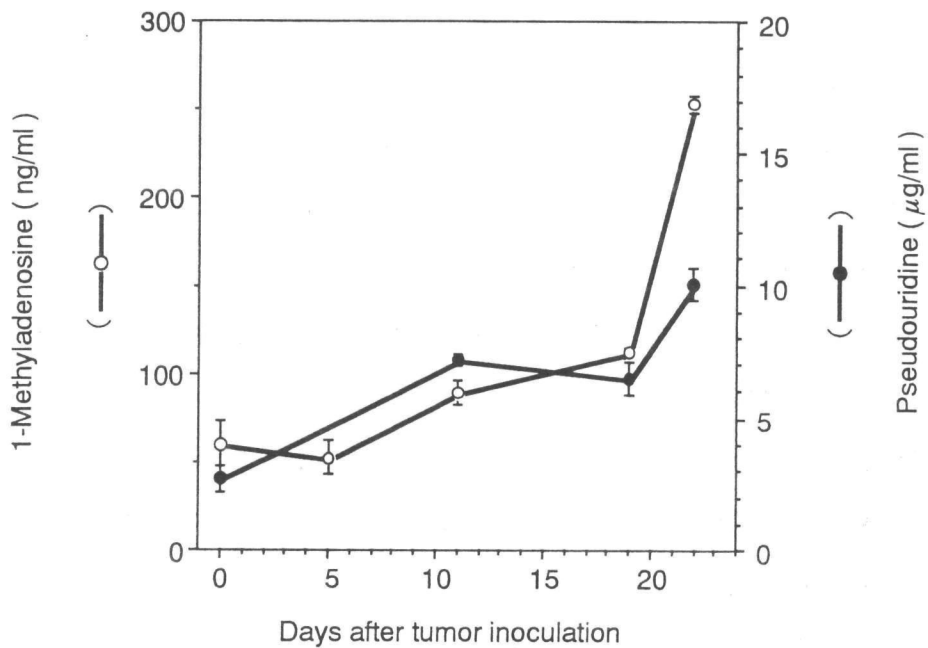


Figure 3-5 Time course of 1-methyladenosine and pseudouridine levels in sera of mice bearing solid tumor. Bars represent standard error.

第4節 考察

腹水型の担癌モデルでは、癌細胞の増殖は移植後5日目以降観察された。この時期は血清中1-メチルアデノシン量の上昇開始時期と一致し、これまでの尿中量の解析から得られた、1-メチルアデノシンが腫瘍の状態をよく反映するという知見と一致するものであった。腫瘍マーカーとしての血清中修飾核酸の新たなプローブとして、その意義が示されたものと考えられる。一方、シュドウリジンも9日目以降増加が認められ、癌細胞の増殖との相関が確認された。

固形の担癌モデルでは、腫瘍細胞はほぼ一定の速さで増大した。血清中の1-メチルアデノシンの増加は5日目以降19日目までは緩やかだったが、その後の3日間は急激であった。シュドウリジンも19日以降急激な増加を示し、腫瘍細胞の増加と完全には相関しなかった。Thomaleらは3-メチルコラントレンによりマウスに繊維芽細胞腫を誘発し、尿中に排泄される修飾核酸の経時変化を検討しているが³²⁾、彼らの結果では排泄量は担癌末期に急激に増加している。今回の固形癌モデルの血清中量の結果は彼らの結果とよく一致しており、癌の病態における修飾核酸の急激な増加に興味を持たれる。

腹水癌モデルと固形癌モデルを比較すると、血清中の修飾核酸量はいずれも5日目以降増加傾向を示すが、増加速度は腹水型の方が大きかった。これは、腫瘍細胞が皮内と比較し腹腔内においてより速く増殖するためと考えられる。この結果は、担癌動物尿中に多量に排泄される修飾核酸が、腫瘍組織でのtRNAの代謝回転が亢進していることに由来するものであるというBorekらの仮説³³⁾を個体レベルで裏付けるものと考えられる。血清中修飾核酸の増加量が生体内での腫瘍細胞量の増加を的確に反映しているという結果により、血清中修飾核酸が腫瘍マーカーとして有用であることが予想されたので、次章では癌患者検体について検討を行った。

第4章 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討

第1節 はじめに

前章の担癌マウスモデルを用いた検討により、血清中修飾核酸の腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。そこで、健常人血清検体を用いて正常値を算出し、カットオフ値を設定した。そして、癌患者血清中量をカットオフ値と比較することにより、血清修飾核酸が腫瘍マーカーとしてヒトに応用可能か否かについて検討した。さらに、血清採取時に同時に採取した尿試料中の修飾核酸量を測定し、血清試料中と尿試料中の含量の差異についても検討した。

第2節 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討

健常人男性 16 人 (20-65 才 : 平均 32.2 才)、健常人女性 15 人 (18-63 才 : 平均 33.5 才) より採取した血清中のシュードウリジンと 1-メチルアデノシン量を測定した (Figure 4-1, 4-2)。

健常人血清中のシュードウリジンの平均値は $1.28 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$ 、1-メチルアデノシンの平均値は $28.3 \pm 7.9 \text{ ng/ml}$ であり、男女間の性差は認められなかった。そこで、カットオフ値として平均値に 2 SD を加えた値である $1.82 \mu\text{g/ml}$ (シュードウリジン)、 44.1 ng/ml (1-メチルアデノシン) を設定した。

固形癌及び白血病患者より尿と血清を同時に採取し、各々に含まれるシュードウリジン、1-メチルアデノシン量を測定した (Table 4-1, 4-2)。固形癌及び白血病患者の血清中、尿中シュードウリジンの陽性率はそれぞれ 36% (9/25)、64% (16/25) であった。血清中シュードウリジンが陽性を示したのは、肝細胞癌、胆管癌、大腸癌各 2 例、胃癌、卵巣癌、子宮癌各 1 例であった。

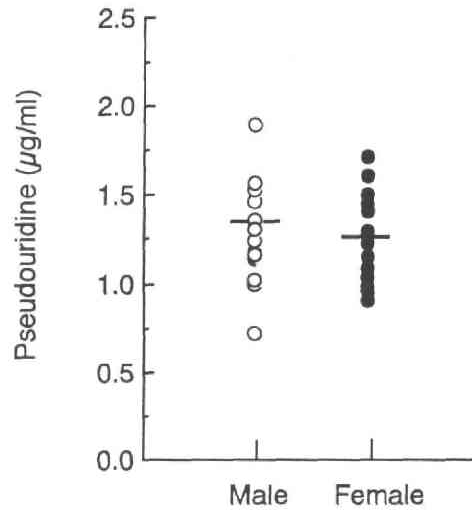


Figure 4-1 Serum levels of pseudouridine in healthy individuals.

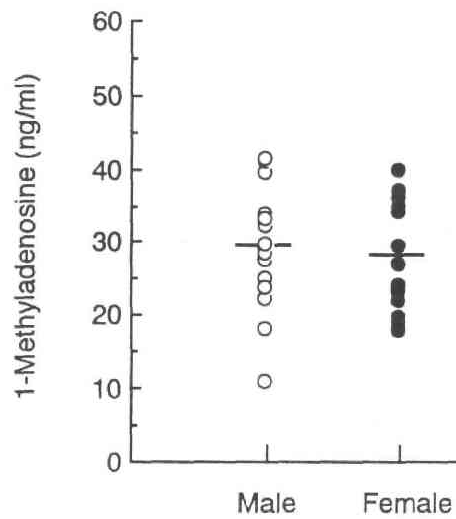


Figure 4-2 Serum levels of 1-methyladenosine in healthy individuals.

Table 4-1 Serum and urinary levels of pseudouridine in cancer patients

Type of cancer ^a	n	Pseudouridine levels	
		Serum ^b	Urine ^c
Leukemia ^d	5	1.13	63.07^e
		1.66	59.51
		1.13	63.22
		1.45	135.05
		1.28	95.90
Stomach	4	0.87	33.12
		0.84	36.42
		2.82^f	17.46
		0.97	26.26
Hepatocellular	4	1.04	30.78
		2.60	36.98
		1.75	53.93
		7.43	52.72
Cholangioma	3	0.18	40.21
		3.66	126.74
		2.03	114.94
Colon	5	2.27	39.71
		1.10	86.91
		0.54	124.85
		1.11	13.59
		3.43	168.06
Ovarian and cervix ^g	4	1.37	34.28
		4.57	86.69
		2.91	161.13
		1.59	60.90
Normal mean value		1.28	31.2
Cut off value		1.82	51.0
Positive/Total		9/25	16/25

^a All leukemia patients were in active status and all solid tumor patients were in advanced stage.

^b The value expressed as $\mu\text{g/ml}$.

^c The value expressed as $\text{nmol}/\mu\text{mol}$ creatinine.

^d Two cases of ALL, two cases of CML, and one case of AML were included.

^e The value with bold letter shows the elevated urinary levels above cut off value.

^f The value with bold letter shows the elevated serum levels above cut off value.

^g Three cases of ovarian cancer and one case of cervix cancer were included.

同じ検体の血清中、尿中 1-メチルアデノシンの陽性率はそれぞれ 16% (4/25)、44% (11/25) であった。血清中 1-メチルアデノシンが陽性を示したのは肝細胞癌 2 例、大腸癌 1 例であった。

第 3 節 考察

癌患者の血清中 1-メチルアデノシン陽性率は 16% (4/25) であるのに対し、尿中量の陽性率は 44% (11/25) であり、両者の陽性率の間には大きな差が認められた。また、血清中シュードウリジンの陽性率は 36% (9/25)、尿中の陽性率は 64% (16/25) であり、同様の傾向であった。1-メチルアデノシンの分子量は 281.3、シュードウリジンの分子量は 244.2 といずれも小さく、限外ろ過によりその濃度が変化しないこと (第 2 章) から明らかなように血清中のタンパク質との相互作用もないことから、血清中のこれらの修飾核酸は血清中に保持されることなく速やかに尿中に排泄されるものと考えられる。このため、癌患者血清であっても尿中で認められるほど高い陽性率が得られなかったものと思われる。

第 3 章の担癌マウスモデルを用いた実験では癌細胞の増殖と血清中の修飾核酸量の増加がほぼ相関したが、ヒト癌患者ではよい相関は認められなかった。担癌マウスモデルに用いた移植癌細胞と実際のヒト癌細胞の増殖特性が異なることや、モデルマウスでは個体に対して癌の大きさが大きくなることから、マウスでよい相関がみられた原因として考えられる。

Amuro らは個々の肝細胞癌患者より血清及び尿を採取して、これらの中に含まれるシュードウリジン量を測定し、血清及び尿の陽性率に大きな差が認められなかったことを報告している²⁷⁾。今回の結果は例数が少ないものの、彼らの結果と一致するものであった。すなわち、肝癌患者のみに限定すると尿中シュードウリジンの陽性率は 50% (2/4) であり、血清中シュードウリジ

Table 4-2 Serum and urinary levels of 1-methyladenosine in cancer patients

Type of cancer ^a	n	1-Methyladenosine levels	
		Serum ^b	Urine ^c
Leukemia ^d	5	13.9	2.65
		15.5	2.13
		20.3	3.00
		26.0	3.71^e
		35.2	3.78
Stomach	4	21.0	1.59
		21.4	2.09
		35.8	1.22
		41.0	1.95
Hepatocellular	4	3.3	1.41
		7.4	1.85
		52.2^f	2.14
		67.8	2.56
Cholangioma	3	11.0	1.67
		31.7	3.98
		53.5	5.15
Colon	5	19.3	1.60
		26.9	4.11
		31.9	5.57
		37.9	13.59
		112.5	8.03
Ovarian and cervix ^g	4	21.4	2.68
		24.4	4.58
		26.7	7.27
		40.7	4.79
Normal mean value		28.3	1.91
Cut off value		44.1	3.23
Positive/Total		4/25	11/25

^a All leukemia patients were in active status and all solid tumor patients were in advanced stage.

^b The value expressed as ng/ml.

^c The value expressed as nmol/ μ mol creatinine.

^d Two cases of ALL, two cases of CML, and one case of AML were included.

^e The value with bold letter shows the elevated urinary levels above cut off value.

^f The value with bold letter shows the elevated serum levels above cut off value.

^g Three cases of ovarian cancer and one case of cervix cancer were included.

ンの陽性率も同等であった。ここで検討した肝癌患者はすべてC型肝炎ウィルスに感染しており、肝炎ウィルス由来のたんぱく因子が修飾核酸の血液内の保持に影響を与えている可能性も考えられる。一方、大腸癌1例において、血清中1-メチルアデノシンがカットオフ値の約3倍高い値を示した。1-メチルアデノシンが免疫抑制活性を持つことから、このような状態の患者体内は一時的な免疫抑制状態に陥っている可能性が考えられる。陽性率の問題から血清中修飾核酸を腫瘍マーカーとしてヒト癌患者に応用することは難しいと思われるが、ここで述べたような生体内変化の検討に応用することにより、その有用性が発揮されることが期待される。

第5章 総括及び結論

(1) 第1章において、白血病とリンパ腫患者を対象として尿中シュードウリジン及び1-メチルアデノシン量を検討した。尿中修飾核酸量は健常人と比較して有意に高かったが、疾患の種類による差異は認められなかった。シュードウリジンと1-メチルアデノシンの定量を併用することにより、白血病、リンパ腫の陽性率は向上した。一方、疾患の状態と尿中修飾核酸量の関係を検討した結果、寛解が導入されたほとんどの症例で尿中修飾核酸量がカットオフ値以下にまで減少した。再発が認められた症例では尿中量の増加がみられた。これらの結果から、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量は疾患の種類よりも、疾患の状態をよく反映することが明らかになった。尿中シュードウリジンと1-メチルアデノシンの白血病及びリンパ腫のモニタリングに対する有用性が示されたものと考えられる。

次に、尿中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性を検討する際に基礎となる、健常人の尿中量の変動を検討した。健常人300人以上を対象とし、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量の性差、年齢差を検討したが、いずれも有意差は認められなかった。また、日内変動、日差変動も認められなかった。これらの結果から、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量は腫瘍以外の内的あるいは外的要因の影響を受けにくく、腫瘍マーカーとして高い特異性を有していることが明らかになった。

(2) 第2章において、血清中1-メチルアデノシンの定量法を確立した。HRPとTMBZを用い、2回ブロッキング操作を行うことにより、測定感度を従来法の10倍に上昇させることに成功した。前処理には限外ろ過を用いた。同時再現性、日差再現性とも良好であり、標準品の添加回収試験の結果も満足

し得るものだった。

(3) 第3章では担癌マウスモデルを用い、血清中1-メチルアデノシン、シュードウリジン量の変動を検討した。腹水癌と固形癌のいずれのモデルにおいても、癌細胞の増加に従い、血清中の修飾核酸量は増加した。腹水癌モデルの方が固形癌モデルより早い時期から血清中量の増加が認められたが、これは腹水癌の方が癌細胞の増殖が速いためと考えられる。

(4) 第4章ではヒト癌患者を対象とし、血清中1-メチルアデノシン、シュードウリジンの腫瘍マーカーへの応用性について検討した。癌患者血清中の修飾核酸量の増加率は予想外に少なく、陽性率は尿検体の陽性率を大きく下回った。これは、血清中修飾核酸が迅速に尿中へ移行していることが原因と考えられる。マウスのモデル(第3章)では癌細胞の増殖にともない血清中修飾核酸量も増加したが、癌患者の結果はこれとは異なるものであった。この理由として、実験腫瘍とヒト腫瘍の増殖特性の違いが考えられる。血清中1-メチルアデノシン、シュードウリジンはC型肝炎ウィルス陽性の肝癌患者で陽性例が認められており、このような病態の検出には応用可能であると考えられる。

癌患者尿中あるいは血清中に増加する修飾核酸は、癌細胞においてRNAの代謝回転が亢進していることに由来すると考えられている。このため、癌の原発組織や臓器によらず、また、転移が発生した組織や臓器によらず腫瘍マーカーとなることが予想される。しかし、同じ理由から、癌細胞のRNAの代謝が遅い場合や癌細胞数が少ない場合には癌の検出が遅れるおそれがある。今後、修飾核酸の腫瘍マーカーとしての信頼性をより向上させるためには、他

の診断法を併用することや癌細胞において顕著に含量が変化する修飾核酸の応用も考えるべきであろう。

第6章 実験材料及び方法

第1節 第1章付属実験

1-1 試薬

1-メチルアデノシンおよびキャリアプロテインとして用いた牛血清アルブミン (BSA) はシグマ社より購入した。他の試薬は分析用グレードのものをを用いた。

1-2 健常人尿及び癌患者尿

本実験で用いた尿試料は健常人 10 人 (男性 7 人、女性 3 人) より一時尿として採取した。日内変動の検討には 9 時、12 時、15 時、18 時に採取した尿を用い、日差変動の検討には連続した 7 日間の毎日 9 時に採取した尿を使用した。

白血病、リンパ腫の型と尿中修飾核酸量との関係の検討は、患者 60 人 (19-72 才) を対象とした。内訳は AML 20 人、AMMoL 10 人、CML 5 人、ALL 8 人、ML 7 人、MM 10 人であった。尿は血液検査による診断確定後、化学療法を開始する前のものをを用いた。病態と尿中修飾核酸量の関係の検討には、患者 20 人を対象とした。内訳は寛解群が ALL 4 人、AML、AMMoL、ML 各 1 人、再発群が AML 4 人、ALL、NHL 各 1 人、安定群が AML 4 人、ATL、ML、MM 各 1 人であった。病態の分類は血液学的所見によった。すなわち、骨髄性白血病の場合、骨髄穿刺液中の幼若細胞が 5% 以内ならば完全寛解、5% より多く 25% 以内であれば部分寛解、25% より多ければ再発とした。リンパ性白血病の場合、骨髄穿刺液中のリンパ芽球が 5% 以内ならば

完全寛解、5% より多ければ再発とした。尿は病態が転帰を迎える前後に採取したものを用いた。

1-3 尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシンの測定

最適抗原抗体量は予め抗原および抗体のタイトレーションを行い、抗体量が抗原量に比べ過剰にならない条件を選択した。従来の方法²³⁾により合成したシュードウリジンあるいは1-メチルアデノシンとBSAの結合体（各10 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ ）を96ウェルプレート（Sumitomo、MS-3496F;ポリスチレン製）に100 μl ずつ分注し、4℃下一晩放置し固相化した。抗原溶液を除いた後、1% BSA-PBSを100 μl ずつ各ウェルに加え37℃、1時間反応させた。次に、溶液を除いた各ウェルにシュードウリジンまたは1-メチルアデノシンの標準品溶液（吸光度より濃度をそれぞれ50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ に調製したもの）あるいはPBSを用いて8, 16, 32倍に希釈した尿検体を50 μl ずつ分注した後に、抗シュードウリジンモノクローナル抗体（APU-6: 5 $\mu\text{g/ml}$ ）あるいは抗1-メチルアデノシンモノクローナル抗体（AMA-2: 1 $\mu\text{g/ml}$ ）を50 μl 加え、4℃で1時間反応させた。反応終了後各ウェルをPBSで5回ずつ洗い、ALP標識ヤギ抗マウスIgG抗体（Tago、3000倍希釈）を100 μl ずつ各ウェルに分注した。4℃、45分間反応させた後、各ウェルをPBSで5回ずつ洗い、*p*-ニトロフェニルフォスフェートを基質とする発色溶液（Sigma 104: phosphatase substrateを1 mg/mlの濃度で含む1 M ジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)）を100 μl ずつ添加した。37℃、20分反応させた後、2 N 水酸化ナトリウム水溶液50 μl を加え反応を停止し、405 nmにおける吸光度を96ウェルプレートリーダー（Model 2550、Bio-Rad）を用いて測定した。測定は全て triplicate で行い、検量線は吸光度を Log-logit 変換することにより作成した。

尿中クレアチニンはクレアチニン・テスト・ワコー（和光純薬）により測定した。

第 2 節 第 2 章付属実験

2-1 試薬

1-メチルアデノシンおよびキャリアプロテインとして用いた牛血清アルブミン（BSA）はシグマ社より購入した。他の試薬は分析用グレードのものを用了。

2-2 1-メチルアデノシンの検量線の作成（阻害 ELISA）

最適抗原抗体量は予め抗原および抗体のタイトレーションを行い、抗体量が抗原量に比べ過剰にならない条件を選択した。従来の方法²³⁾により合成した 1-メチルアデノシンと BSA の結合体（50 ng/ml）を 96 ウェルプレート（Sumitomo、MS-7196F;ポリビニルクロライド製）に 100 μ l ずつ分注し、4℃下一晩放置し固相化した。抗原溶液を除いた後、0.05% Tween 20 含有 1% BSA-PBS を 100 μ l ずつ各ウェルに加え 37℃、1 時間反応させた。次に、溶液を除いた各ウェルに 1-メチルアデノシンの標準品溶液（吸光度より濃度を 300, 100, 30, 10, 3, 1 ng/ml に調製したもの）を 50 μ l ずつ分注した後、AMA-2 培養上清（200 倍希釈液）50 μ l を加え、4℃で 1 時間反応させた。反応終了後各ウェルを 0.05% Tween 20 含有 PBS で 3 回、PBS で 2 回ずつ洗い、先の条件で再びブロッキングを行った。ブロッキング剤を除いた後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Tago、3000 倍希釈）を 100 μ l ずつ各ウェルに分注し、4℃、45 分間反応させた。抗体液を除き、先と同様に洗浄を行った後、TMBZ を基質とする発色溶液（Sumitomo、ML-1120T）を 100 μ l ず

つ添加した。室温、15 分反応させた後、同キットに含まれている停止液 100 μ l を加え反応を停止し、450 nm における吸光度を 96 ウェルプレートリーダー (UVmax、Molecular Devices) を用いて測定した。測定は全て triplicate で行った。検量線は吸光度を Log-logit 変換することにより作成した。

2-3 血清の調製

健常人より採取した血液を、室温あるいは 37 $^{\circ}$ C で 2 時間以上静置した後、4 $^{\circ}$ C 下 3000 rpm で 20 分間遠心し上清を回収した。用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

2-4 血清の前処理法および添加回収試験

調製した血清をセントリコン-10 (アミコン、分画分子量 10000) を用いて遠心限外ろ過 (7000 rpm, 20-60 分, 10 $^{\circ}$ C) し、そのろ液を回収した。これに 1-メチルアデノシン標準品を最終濃度 30 ng/ml になるように添加し、2-2 の方法と同様に阻害 ELISA を行った。前処理前添加群では標準品の添加を前処理前に行い測定した。測定値と 1-メチルアデノシン非添加時の測定値との差を回収量とし、この値を添加量で除し回収率を求めた。

2-5 同時再現性試験

前処理を行った健常人の血清を 96 ウェルプレートに 1 検体あたり 1 枚以内に分注し、同一プレートの各ウェルでの再現性について検討した。定量は 2-2 の方法に準じて行った。

2-6 日差再現性試験

前処理を行った健常人血清の同一検体の定量を異なった日に実施し、再現性について検討した。 定量は 2-2 の方法に準じて行った。

第 3 節 第 3 章付属実験

3-1 動物

雄性 BALB/c マウスは東北大学医学部付属動物実験施設マウスセンターより購入した。 実験には 6 週令のものを使用した。

3-2 培地

東北大学医学部組織培養室より供給された RPMI-1640 培地に、100 u/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、60 μ g/ml カナマイシンを加えたものを腫瘍細胞移植時に細胞懸濁液として利用した。

3-3 腹水癌モデル

雄性 BALB/c マウス（6 週令）に Meth A 繊維芽細胞腫細胞を 1×10^6 cells/ml の濃度に RPMI-1640 培地で懸濁したものを、0.5 ml 腹腔内移植した。移植後 5, 9, 12 日目に頸動脈切断により脱血死させ、血液を採取した。 腹水の採取が可能な場合はそのまま採取し、不可能な場合は PBS 5 ml を腹腔内に注入後回収し、腹水量を測定した。 PBS を注入した場合の腹水量の補正は、正常マウスで同じ操作を行った場合 4 ml 回収可能であったことから、回収量から 4 ml を減ずることにより行った。 パック細胞容積は腹水を 4 $^{\circ}$ C、3000 rpm で 20 分遠心した時の沈澱の量として求めた。

3-4 固型癌モデル

雄性 BALB/c マウス (6 週令) に Meth A 細胞を 5×10^6 cells/ml の濃度に RPMI-1640 培地で懸濁したもの 0.1 ml を、皮内移植した。移植後 5, 11, 19, 22 日に頸動脈を切断し、血液を回収した。腫瘍の短径と長径を測定し、その積の平方根を大きさとした。

3-5 血清中 1-メチルアデノシン、シュードウリジンの測定

採取したマウス血液は 2-3 及び 2-4 と同様な方法で処理した。血清中 1-メチルアデノシンの測定は 2-2 の方法で行った。血清中のシュードウリジンの測定は基本的に 1-3 と同様な方法で行った。すなわち、従来の方法²²⁾により合成したシュードウリジンと BSA の結合体 ($1 \mu\text{g/ml}$) を 96 ウェルプレート (Sumitomo, MS-7196F; ポリビニルクロライド製) に $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C 下一晩放置し固相化した。抗原溶液を除いた後、1% BSA-PBS を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え 37°C 、1 時間反応させた。次に、溶液を除いた各ウェルにシュードウリジンの標準品溶液 (吸光度より濃度を 30, 10, 3, 1, 0.3, $0.1 \mu\text{g/ml}$ に調製したもの) あるいは前処理を行った血清検体を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した後に、APU-6 培養上清 (15 倍希釈液) $50 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で 1 時間反応させた。反応終了後各ウェルを 0.05% Tween 20 含有 PBS で 3 回、PBS で 2 回ずつ洗い、ALP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago, 3000 倍希釈) を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに分注し、 4°C 、45 分間反応させた。抗体液を除き、先と同様に洗浄を行った後、*p*-ニトロフェニルフォスフェートを基質とする発色溶液 (Sigma 104: phosphatase substrate を 1 mg/ml の濃度で含む 1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8)) を $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。 37°C 、20 分反応させた後、2 N 水酸化ナトリウム水溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え反応を停止し、405 nm における吸光度を 96 ウェルプレートリーダー (UVmax、Molecular

Devices) を用いて測定した。測定は全て triplicate で行い、検量線は吸光度を Log-logit 変換することにより作成した。

第4節 第4章付属実験

4-1 健常人血清及び癌患者血清

健常人男性 16 人 (20-65 才、平均 32.2 才)、健常人女性 15 人 (18-63 才、平均 35.5 才) から血液を採取し、2-3 の方法に従って処理し、血清試料とした。癌患者血清は男性 12 人 (42-86 才、平均 60.1 才)、健常人女性 13 人 (36-84 才、平均 64.5 才) から採取したものを用いた。血清中 1-メチルアデノシンの測定は 2-2 の方法で行い、シュードウリジンの測定は 3-5 と同様な方法で行った。

4-2 癌患者尿

4-1 の癌患者の血液採取時に同時に尿を採取し、保存剤を加えずに -80℃ あるいは -20℃ に保存した。尿中 1-メチルアデノシン、シュードウリジンの測定は 1-3 の方法に準じて行った。尿中クレアチニンはクレアチニン・テスト・ワコーにより測定した。

引用文献

1. Limbach, P. A., Crain, P. F. & McCloskey, J. A. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2183-2196 (1994).
2. Admiak, R. W. & Gornicki, P. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* **32**, 27 (1985).
3. Björk, G. R., Ericson, J. V., Gustafsson, C. E. D., Hagervall, T. G., Jönsson, Y. H. & Wikström, P. M. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 263-287 (1987).
4. Elliott, M. S. & Trewyn, R. W. *J. Biol. Chem.* **259**, 2407-2410 (1984).
5. Hankins, W. D. & Farkas, W. R. *Biochim. Biophys. Acta* **213**, 77-89 (1970).
6. Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino Y., Nishimura, S., Miyazawa, T. & Yokoyama S. *Nature* **336**, 179-181 (1988).
7. Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura H., Yamaizumi, Z., Nishimura S. & Miyazawa T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4905-4909 (1985).
8. Lusting, F., Elias, P., Axberg, T., Samuelsson, T., Tittawella, I. & Lagerkvist, U. *J. Biol. Chem.* **256**, 2635 (1981).
9. Sekiya, T., Takeishi, K. & Ukita, T. *Biochim. Biophys. Acta* **182**, 411 (1969).
10. Söll, D. *Science* **23**, 293-299 (1971).
11. Ishida, N. *Yakugaku Zasshi* (in Japanese) **105**, 91-108 (1984).
12. Takano, S., Sami, S., Majima, T. & Ishida, N. *J. Immunopharmacol.* **8**, 59-73 (1986).

13. Itoh, K., Majima, T., Edo, K., Mizugaki, M. & Ishida, N. *Tohoku J. Exp. Med.* **1157**, 205-214 (1989).
14. Borek, E. *Cancer Res.* **31**, 596-597 (1971).
15. Uziel, M. & Smith L. H. *Fed. Proc.* **35**, 1675 (1976).
16. Kuchino, Y. & Borek E. *Nature* **271**, 126-129 (1978).
17. Tamura, S., Fujii, J., Nakano, T., Hada, T. & Higashino, K. *Clin. Chim. Acta* **154**, 125-132 (1986).
18. Tamura, S., Amuro, Y., Nakano, T., Fujii, J., Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Hada, T. & Higashino, K. *Cancer* **57**, 1571-1575 (1986).
19. Muller, J., Erb, N., Heller-Schoch, G., Lorenz, H., Winkler, K. & Schoch, G. *Recent Results Cancer Res.* **84**, 317-330 (1983).
20. Sharma, O. K., Waalkes, T. P., Gehrke, C. W. & Borek, E. *Cancer Detect. Prev.* **6**, 77-85 (1983).
21. Masuda, M., Nishihira, T., Itoh, K., Mizugaki, M., Ishida, N. & Mori, S. *Cancer* **72**, 3571-3578 (1993).
22. Itoh, K., Mizugaki, M. & Ishida, N. *Clin. Chim. Acta* **181**, 305-316 (1989).
23. Itoh, K., Mizugaki, M. & Ishida, N. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 1130-1138 (1988).
24. 大倉久直編, 腫瘍マーカー (中外医学社, 東京, pp1-7, 1992)
25. Mitchell, E. P., Evans, L., Schultz, P., Richard, M., Yabro, J. W. Gehrke, C. W. & Kuo, K. *J. Chromatogr.* **581**, 31-40 (1992).
26. Umegae, Y., Nohta, H. & Ohkura, Y. *J. Chromatogr.* **515**, 495-501 (1990).
27. Amuro, Y., Nakaoka, H., Shimomura, S., Tamura, S., Hada, T. &

- Higashino, K. *Clin. Chim. Acta* **172**, 117-122 (1988).
28. Amuro, Y., Nakaoka, S., Shimomura, S., Fujikura, M., Yamamoto, T., Tamura, S., Hada, T. & Higashino, K. *Clin. Chim. Acta* **178**, 151-158 (1988).
29. Tamura, S., Fujioka, H., Nakano, T., Hada, T. & Higashino, K. *Cancer Res.* **47**, 6138-6141 (1987).
30. Colonna, A., Russo, T., Esposito, F., Salvatore, F. & Cimino, F. *Anal. Biochem.* **130**, 19-26 (1983).
31. Salvatore, F., Cimino, L., Russo, T., Mazzacca, G., Colonna, A. & Cimino, F. *Cancer Detect. Prev.* **6**, 531-536 (1983).
32. Thomale, J. & Nass, G. *Recent Results Cancer Res.* **84**, 378-387 (1983).
33. Borek, E., Baliga, B., Gehrke, C., Kuo, C., Belman, S., Troll, W. & Phillip, T. *Cancer Res.* **37**, 3362-3366 (1977).

謝 辞

本研究を行うにあたり終始御指導御鞭撻を賜りました東北大学医学部附属病院薬剤部教授水柿道直先生に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり御指導御鞭撻を賜りました東北大学薬学部薬剤学講座教授鈴木康男先生に感謝致します。

また親切的御助言と御激励を頂きました東北大学医学部附属病院薬剤部助教授菱沼隆則先生に深く御礼申し上げます。

さらに本研究に際し、終始御親切なる御指導、御協力を頂きました東北大学医学部附属病院薬剤部助手伊藤邦彦先生に深く感謝いたします。

血清の提供を始めとして、多大な御協力を頂きました東北大学医学部附属病院薬剤部の皆様に心より感謝致します。

正誤表

誤	正
11ページ、11行目	mol/ μ mol クレアチニン nmol/ μ mol クレアチニン